



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK  
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

**PATENTSCHRIFT 148 290**

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl. 3

(11) 148 290 (44) 20.05.81 3(51) A 23 J 1/14  
(21) WP A 23 J / 218 320 (22) 07.01.80

---

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD  
(72) Brückner, Jürgen, Dr. Dipl.-Lebensmittelchem.; Kroll,  
Jürgen, Dr. Dipl.-Lebensmittelchem.; Mieth, Gerhard, Dr.  
Dipl.-Lebensmittelchem.; Pohl, Joachim, Dr.  
Dipl.-Lebensmittelchem., DD  
(73) siehe (72)  
(74) AdW der DDR, FZ für Molekularbiologie und Medizin,  
Zentralinstitut für Ernährung, Büro für Schutzrechte und  
Neuererwesen, 1505 Bergholz-Rehbrücke, Arthur-Scheunert-  
Allee 114-116

---

(54) Verfahren zur Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinen

---

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinkonzentraten und -isolaten aus phenolsäurehaltigen pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise aus Sonnenblumen- und Rapsamen sowie deren Verarbeitungsprodukten. Die Produkte dienen zur Herstellung proteinangereicherter Lebensmittel oder simulierter Proteinerzeugnisse. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, spezifische Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die einer Oxydation phenolischer Verbindungen entgegenwirken und zu hellfarbigen farbstabilen Proteinpräparaten führen. Erfindungsgemäß werden aus schalenfreien Rohstoffen gewonnene Proteinextrakte oder Feuchtisolate mit einem Acylierungsmittel, vorzugsweise Acetanhydrid, bei einem pH-Wert von 4 bis 6, sowie Salzkonzentrationen von 3 bis 10% in der Kälte umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von mindestens 6 h werden die Proteine bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 gefällt, durch Zentrifugieren abgetrennt, gewaschen und getrocknet.

**BEST AVAILABLE COPY**

-1- 218320

Erfinder Dr. Jürgen Brückner  
Dr. Jürgen Kroll  
Dr. Gerhard Mieth  
Dr. Joachim Pohl

Verfahren zur Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinkonzentraten und -isolaten aus phenolsäurehaltigen pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise aus Sonnenblumen- und Rapssamen sowie deren Verarbeitungsprodukten. Die verfahrensgemäß gewonnenen Produkte lassen sich für die Herstellung proteinangereicherter traditioneller Lebensmittel oder simulierter Proteinerzeugnisse für die menschliche Ernährung einsetzen und zeichnen sich durch verbesserte organoleptische Eigenschaften aus.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Bestimmte Pflanzenproteine unterliegen, insbesondere im alkalischen oder neutralen Milieu, einer unerwünschten Farbreversion, die deren Gebrauchswert als Lebensmittel-Zusatzstoff einschränkt; das trifft insbesondere für Sonnenblumen- und Rapsproteine zu. Ursache dafür ist deren Gehalt an Farbstoffen, die einmal aus Schalenpigmenten bestehen, zum anderen durch Oxydation von phenolischen

**BEST AVAILABLE COPY**

Verbindungen gebildet und irreversibel an Proteine gebunden werden. Damit einher geht im weiteren eine Blockierung wertbestimmender funktioneller Gruppen, wie die des verfügbaren Lysins, und es entstehen typische off-flavour-Komponenten.

Es sind verschiedene Lösungswege beschrieben worden, um solche Veränderungen einzuschränken bzw. zu verhindern. Der Farbbeeinträchtigung durch Schalenpigmente kann am besten durch vollständige Schalenentfernung begegnet werden. Das Verfahren der Wahl dafür stellt die Schälung mittels Schlagleistenschälern und anschließende partielle Schalenabtrennung durch Windsichtung und Siebung, gegebenenfalls in Verbindung mit einer vollständigen Schalenabtrennung durch Sedimentation, Flotation oder im elektrischen Feld dar.

Auch für die Hintanhaltung der durch Oxydation der phenolischen Verbindungen hervorgerufenen Farbveränderungen sind verschiedene Verfahren bekannt geworden. Diese beruhen einmal darauf, daß Phenolsäuren, wie z. B. Chlorogensäure, aus den Ausgangsmaterialien (Samen, Schrote) oder Endprodukten (Isolate, Kornanteile), extraktiv entfernt werden. Dafür verwendet man verschiedene Lösungsmittel, speziell Alkohole, verdünnte Salzsäure oder Wasser und deren Gemische. Die Extraktion wird im Batch-Verfahren, im Gegenstromverfahren oder als kontinuierliche Diffusionsextraktion durchgeführt. Nachteilig dabei ist jedoch der hohe Extraktionsaufwand, da ein Teil der Chlorogensäure relativ fest an bestimmte Proteinfraktionen gebunden ist. Als weitere Nachteile sind die mit der Extraktion der Chlorogensäure verbundenen Verluste an löslichen Proteinen, sowie der bei der Verwendung organischer Lösungsmittel zu leistende Aufwand für deren Rückgewinnung zu nennen.

Andere Wege zur Lösung der Verfärbungsproblematik gehen von Proteinextrakten aus und nutzen das unterschiedliche

Adsorptions- bzw. Fällungsverhalten von phenolischen Verbindungen aus, um deren Abtrennung von Proteinen durch Zusatzstoffe, beispielsweise von Aluminium- oder Erdalkalisalzen oder Polyamiden zu erreichen. Diese Verfahren sind jedoch entweder mit dem Nachteil einer Mitadsorption von Proteinen oder einer Kontamination von Proteinen mit dem Adsorptionsmittel behaftet, wodurch Ausbeuteverluste resultieren, oder zusätzliche Reinigungsoperationen erforderlich werden.

Die Acylierung von organischen Substraten ist eine bekannte Methode zur Herstellung entsprechender Derivate; das trifft gleichfalls für die Acetylierung oder Succinylierung von Aminosäuren und Proteinen zu. Beispielsweise acyliert man die Aminogruppen von freien essentiellen Aminosäuren, die Proteinen zur Supplementierung zugesetzt werden, um deren Reaktion mit Carbonylen zu verhindern. In diesem Falle wird jedoch im Gegensatz zu Methionin und Threonin die Verfügbarkeit von Lysin durch Blockierung von Aminogruppen stark eingeschränkt.

Gemäß der Patentschrift DD WP 130 442 wird eine Modifizierung von Proteinen durch Acetylierung von Proteinen, vorzugsweise von Ackerbohnenproteinen, zwecks Verbesserung des Gelbildungsvermögens vorgenommen; dabei erfolgt speziell eine Acetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins. Verfärbungen von phenolsäurehaltigen Proteinen werden durch die dort angeführte Behandlung nicht vermieden. Außerdem spielt bei Ackerbohnenproteinisolaten eine Verfärbung durch Oxydation phenolischer Verbindungen keine Rolle.

#### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht demzufolge in der Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinen aus phenolsäurehaltigen pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise Sonnenblumen- und Rapssamen sowie deren Ver-

**BEST AVAILABLE COPY**

erarbeitungsprodukten, mit verbesserten funktionellen, insbesondere organoleptischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften, die deren universellen Einsatz in der Humanernährung ermöglichen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, spezifische Bedingungen aufzuzeigen, die einer Oxydation phenolischer Verbindungen entgegenwirken und die Herstellung hellfarbiger, farbstabiler Proteinpräparate gestatten. Gleichzeitig sollen dadurch Produkte mit guten anderen funktionell-anwendungstechnischen, organoleptischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften erhalten werden.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden Proteine mit verbesserten funktionellen, insbesondere organoleptischen Eigenschaften, d. h. hellfarbige, farbstabile Produkte aus phenolsäurehaltigen pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise Sonnenblumen- und Rapssamen sowie deren Verarbeitungsprodukten, dadurch gewonnen, daß nach einer weitgehenden Abtrennung der Schalen aus den Rohstoffen die Reaktivität farbbildender Inhaltsstoffe, speziell phenolischer Verbindungen, durch Umsetzung mit einem Acylierungsmittel, vorzugsweise Acetanhydrid, im sauren Milieu so beeinflußt wird, daß die sonst im alkalischen Milieu ablaufende Oxydation unter Bildung eines fargebenden chinoiden Systems verhindert wird. Es wurde nämlich gefunden, daß zur Blockierung phenolischer Hydroxylgruppen, von phenolischen Verbindungen enthaltenen pflanzlichen Proteinrohstoffen, die Anhydride organischer Säuren, wie z. B. Acetanhydrid, prädistiniert sind. Während jedoch die bekannte Acetylierung von Proteinen bevorzugt bei pH-Werten zwischen 7-8 durchgeführt wird, wobei eine Acetylierung an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins erfolgt, wird erfindungsgemäß die Acetylierung von phenolischen Verbindungen im sauren pH-Bereich zwischen pH 4 und 6, vorzugsweise pH 5, in der Kälte, vorzugsweise bei 0-4 °C, ausgeführt, wobei überwiegend Hydroxylgruppen-

haltige Verbindungen verestert werden. Nach einer Reaktionszeit von mindestens 6 h wird der pH-Wert auf einen Wert von pH 3 bis 4 eingestellt, worauf die präzipitierten Proteine durch Zentrifugieren abgetrennt, gewaschen und getrocknet werden.

Die bei der Umsetzung erreichte Blockierung der Hydroxylgruppen führt zu der oben beschriebenen Wirkung hinsichtlich der Vermeidung der durch Oxydation von Phenolsäuren hervorgerufenen Dunkelfärbung der Proteinpräparate bzw. einer Farbreversion während der Verarbeitung.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere bei der Herstellung von Proteinisolaten anwendbar, jedoch prinzipiell auch auf Proteinkonzentrate übertragbar, wobei sich allerdings das Einsatzverhältnis von Acylierungsmittel zu Protein aufgrund der Anwesenheit veresterbarer Kohlenhydrate erhöht.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird aus schalenfreien Ölsamenmehlen bzw. -extraktionsschrotten mittels wäßriger Elektrolytlösungen hoher Ionenstärke bzw. Salzkonzentration von 3 bis 10 %, vorzugsweise 5 %, vorzugsweise einer 3 bis 10 %igen Kochsalzlösung, ein Proteinextract hergestellt. Diesem wird nach Abtrennung des Rückstandes, Einstellung eines pH-Bereiches zwischen 5 und 6 und Abkühlen auf Temperaturen unter 5 °C unter Rühren langsam Acethydrid zugesetzt, wobei ein Verhältnis von Phenolsäuren : Acetanhydrid wie 1 : 4 bis 1 : 20, vorzugsweise 1 : 8, gewählt und durch Zugabe von verdünnter Natronlauge der pH-Wert konstant gehalten wird.

Es ist für die Erfindung wesentlich, daß die Acetylierung in einer sowohl Phenolsäuren als auch Proteine enthaltenden wäßrigen Elektrolytlösung hoher Ionenstärke bzw. Salzkonzentration durchgeführt wird, da nur in diesem Falle elektrostatische Bindungen zwischen Proteinen und Phenolsäuren so weit gelockert werden, daß eine vollständige

Veresterung letztgenannter Verbindungen erfolgt. Als Elektrolytlösungen kommen die wässrigen Lösungen der Alkalisalze ein- und mehrbasischer Säuren, vorzugsweise Natriumchlorid, Natriumsulfat, Natriumsulfit und Natriumphosphat in Frage.

Wie weiterhin gefunden wurde, wirkt sich ein Zusatz niedermolekularer Alkohole - vermutlich durch Spaltung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Proteinen und Phenolsäuren - vorteilhaft im Hinblick auf einen quantitativen Umsatz bei der Acylierung der phenolischen Hydroxylgruppen in Gegenwart präzipitierter Proteine aus.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens werden daher durch Zentrifugation präzipitierter Proteine anfallende Feuchtproteinisolate mit niederen Alkoholen, vorzugsweise mit Methyl- oder Äthylalkohol, im Verhältnis 1 : 1 bis 10 : 1, vorzugsweise 2 : 1 bis 5 : 1, bezogen auf den Proteingehalt, versetzt; danach wird die Acetylierung und Weiterverarbeitung in der oben beschriebenen Weise durchgeführt. In diesem Falle kann auf eine Kühlung während der Acetylierung verzichtet werden.

Die Erfindung wird durch nachstehende Beispiele erläutert.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

50 g Rapsextraktionsschrot werden mit einer 5 %igen Kochsalzlösung angemaischt, und durch Rühren bei pH 6,0 werden daraus die Proteine extrahiert. Der Proteinextrakt wird durch Zentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen befreit und auf 3 °C abgekühlt. Man stellt einen pH-Wert von 5,0 ein und gibt unter Rühren tropfenweise 3 ml Acetanhydrid zu, wobei die vorgegebenen Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert) durch Kühlen bzw. Zugabe von Natronlauge konstant gehalten werden. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wird die Kühlung entfernt und das Rühren

für 24 Stunden fortgesetzt. Danach trennt man das bei pH 3,5 gefällte Proteinisolat durch Zentrifugieren ab und wäscht es im Verhältnis 1 : 5 mit Wasser. Nach Trocknung erhält man 8 g eines farbstabilen Proteinisolates.

### Beispiel 2

50 g schalenfreie Sonnenblumensamen werden mit 500 ml einer 10 %igen Kochsalzlösung angemaischt, und durch Rühren bei pH 7,0 werden die Proteine extrahiert. Der Proteinextrakt wird durch Zentrifugieren abgetrennt und auf 3 °C abgekühlt. Nach Einstellen auf pH 5,0 gibt man unter Rühren und Fortsetzen der Kühlung 3 ml Acetanhydrid hinzu, wobei der pH-Wert konstant gehalten wird. Danach wird wie im Beispiel 1 verfahren. Man erhält 3 g eines farbstabilen Proteinisolates.

### Beispiel 3

50 g durch Extraktion und Präzipitation nach Beispiel 1 aus schalenfreiem Sonnenblumen-Extraktionsschrot isoliertes Feuchtprotein werden mit 100 ml einer 5 %igen Kochsalzlösung angemaischt und mit 10 ml Äthylalkohol versetzt. Man stellt auf pH 5 ein und gibt unter Rühren 5 ml Acetanhydrid zu, wobei der vorgegebene pH-Wert durch Zusatz von Natronlauge konstant gehalten wird. Nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden werden die Proteine bei pH 3,5 durch Zentrifugieren abgetrennt, gewaschen und getrocknet. Man erhält 6 g eines hellen, farbstabilen Proteinisolates.

BEST AVAILABLE COPY

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von verfärbungsstabilen Proteinisolaten aus phenolsäurehaltigen pflanzlichen Proteinrohstoffen durch Extraktion von Proteinen und Acylierung anwesender phenolischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß aus schalenfreien Rohstoffen, vorzugsweise schalenfreien Sonnenblumen- und Rapssamen, gewonne Proteinextrakte oder Feuchtisolale mit einem Acylierungsmittel, vorzugsweise Acetanhydrid, bei pH 4 bis 6, vorzugsweise pH 5, sowie Salzkonzentrationen von 3 bis 10 %, vorzugsweise 5 %, in der Kälte, vorzugsweise bei 0 bis 4 °C, umgesetzt werden, und daraus nach einer Reaktionszeit von mindestens 6 h durch Einstellung eines pH-Wertes zwischen 3 und 4 Proteine präzipitiert, durch Zentrifugieren abgetrennt, gewaschen und getrocknet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösungen die Lösungen der Alkalosalze ein- und mehrbasischer Säuren, vorzugsweise Natriumchlorid, Natriumsulfat, Natriumsulfit und Natriumphosphat, verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Acylierung von Feuchtproteinisolaten in Gegenwart von niederen Alkoholen, vorzugsweise von Methyl- oder Äthylalkohol, durchgeführt wird, wobei das Einsatzverhältnis von Protein zu Alkohol 1 : 1 bis 10 : 1, vorzugsweise 2 : 1 bis 5 : 1, beträgt.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Acetylierung bei einem Verhältnis von Phenolsäuren : Acetanhydrid von 1 : 4 bis 1 : 20, vorzugsweise 1 : 8, durchgeführt wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)